

# 口腔扁平上皮癌における自己分泌型運動促進因子 発現に関する研究

## 第2報：ヒト癌組織の免疫組織化学的所見

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻細胞浸潤学  
(旧講座名：歯科口腔外科)  
(主任：山本悦秀教授)

宮 田 就 弘

自己分泌型運動促進因子 (autocrine motility factor, AMF) により促進される癌細胞の運動能がヒト口腔扁平上皮癌の浸潤に関連しているか否かを検討した。65症例の口腔扁平上皮癌一次症例に対して、免疫組織化学的染色を施行したところ、正常上皮部にはAMFの発現が認められず、癌組織にのみ発現が認められた。また発現強度では、14症例に強陽性、21症例に弱陽性、30症例は陰性であった。AMFの発現と臨床病理組織学的因子との関係については、Stage分類、T分類、癌浸潤様式および所属リンパ節転移の有無との間に有意な相関が認められ、AMFの発現症例で悪性度が高い結果であった。また、Kaplan-Meier法による累積生存率分析ではAMFの発現症例においては有意な差をもって予後は不良であった。以上の結果より、口腔扁平上皮癌の浸潤能はAMFによる細胞運動能の亢進により獲得されており、AMFが口腔扁平上皮癌の浸潤と密接な関係にあることが明らかとなった。

**Key words** autocrine motility factor, mode of invasion, human oral squamous cell carcinoma

口腔癌においてその大部分をしめる扁平上皮癌は、細胞の癌化にともない周囲組織を破壊しながら、浸潤、転移と病態を進行させていく。その浸潤過程においては、組織分解の亢進<sup>1)2)</sup>、細胞間接着機構の減弱<sup>3)4)</sup>、腫瘍の血管新生<sup>5)6)</sup>など多種多様な現象が生じていると考えられる。これらの中にて、著者は口腔扁平上皮癌の浸潤過程において、自己分泌様式で細胞運動能を亢進する自己分泌型運動促進因子 (autocrine motility factor, AMF)<sup>7)</sup>に着目し、第1報としてAMFと浸潤との関連について各種癌細胞株を用いて検索した。その結果、癌細胞がびまん性に浸潤する高度な浸潤能を有する細胞株のみがAMFおよびAMFレセプター蛋白<sup>8)</sup>を発現しており、その細胞株の運動能およびコラーゲン・ゲルを用いた浸潤モデルでの浸潤能は、AMFの作用を阻害することにより抑制することが可能であった。しかしながら、実際のヒト口腔扁平上皮癌組織においてAMFが発現しているか否か、また、その発現と癌の進展、および悪性度との関係などは明らかではない。AMFの発現と悪性度との間に何らかの関連が認められるならば、臨床における治療法の選択に有用な情報を提供し、さらに、いまだ不明な点が多い癌浸潤機構の解明にも寄与するものと期待される。そこで本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌組織を用いてAMFに対する免疫組織化学的染色を行い、その発現と各症例の腫瘍の大きさ、分化度、所属リンパ節転移や予後などの臨床病理学的因子、特に山本・小浜の癌浸潤様式 (表1)<sup>9)</sup>との関係に注目して検索を行った。

## 材料および方法

### I. 対象症例

1989年1月から1999年12月の間に金沢大学医学部附属病院歯科口腔外科で治療された口腔扁平上皮癌一次症例の治療前生検組織65症例を対象とした。生検材料は同病院病理部にてホルマリン固定後パラフィン包埋ブロックとして保存されているものを使用した。症例の内訳は男性35例、女性30例で、年齢は25歳から93歳、平均66歳であった。病期分類は頭頸部癌取り扱い規約改訂第2版<sup>10)</sup>に基づいて、原発部位、原発腫瘍の大きさ (T分類)、頸部リンパ節転移の有無 (N分類)、腫瘍の進展

Table 1. Histological grading of mode of invasion

Grade	Histological features
1	Well-defined borderline
2	Cord, less marked borderline
3	Groups of cells, no distinct borderline
4C	Diffuse invasion of cord-like type
4D	Diffuse invasion of diffuse type

The mode of invasion of HOSCC is a histologic factor, focused at the tumor-host border, and indicates the intensity of tumor invasion<sup>9)</sup>.

平成13年11月29日受付、平成14年2月6日受理

Abbreviations: AMF, autocrine motility factor; HOSCC, human oral squamous cell carcinoma

度 (Stage 分類) について分類した。病理組織学的には分化度および癌浸潤様式について分類した (表2)。

Ⅱ. AMF に対する免疫組織化学染色法

パラフィン包埋された癌組織を4  $\mu$ mの厚さに薄切し、シリコンコーティングを施したスライドガラスに貼付させ、24時間乾燥を行った。100%キシレン (和光純薬, 大阪) で10分間、3回の脱パラフィンを行った。100%エタノールにて10分間3回の脱キシレンを行い、90%エタノールを1回、50%エタノールを1回の親水化を行った後、PBS溶液に浸した。0.1Mクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で500 W, 5分間、2回のマイクロウェーブ処理を行い、室温まで放置した後新しいPBSに浸した。その後室温にて0.3%過酸化水素水 (和光) 加PBS (日本製薬, 東京) にて20分間内因性ペルオキシダーゼを阻害した。続いて、10分間、正常ヤギ血清 (ダコ・ジャパン, 東京) にてブロッキングを行った後、一次抗体として抗AMFポリクローナルウサギ抗体 (anti-AMF polyclonal rabbit antibody) (群馬大学医学部整形外科学講座・渡辺秀臣講師より供与) をPBSで500倍に希釈し、4℃にて24時間反応させた。つぎにPBSで5分間3回洗浄し二次抗

体として、ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体および抗ウサギイムノグロブリン抗体 (ダコ・ジャパン, 東京) を室温で40分間反応させた。PBSにて5分間3回洗浄後、発色剤として0.02%ジアミノベンゼジン (3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (和光) を使用し、顕微鏡で発色状態を確認しながら室温で約5分間反応させた。水道水で10分間洗浄後ヘマトキシリン (武藤化学, 東京) にて核染色を行った。全過程終了後、脱水、透徹し封入後光顕的に観察した。なお、陰性コント

Table 2. Clinicopathological findings in human oral squamous cell carcinomas

Clinicopathological findings	No. of cases (%)
Tumor site	
Tongue	31 (47.7)
Gingiva	20 (30.8)
Floor of mouth	8 (12.3)
Buccal mucosa	3 (4.6)
Soft palate	2 (3.1)
Lip	1 (1.5)
T classification	
T1	15 (23.1)
T2	31 (47.7)
T3	11 (16.9)
T4	8 (12.3)
Stage	
I	14 (21.5)
II	26 (40.0)
III	13 (20.0)
IV	12 (18.5)
Lymph node metastasis	
Negative	49 (75.4)
Positive	16 (24.6)
Cell differentiation	
Well	50 (76.9)
Moderate	11 (16.9)
Poor	4 (6.2)
Mode of invasion	
1	10 (15.4)
2	8 (12.3)
3	31 (47.7)
4C	13 (20.0)
4D	3 (4.6)

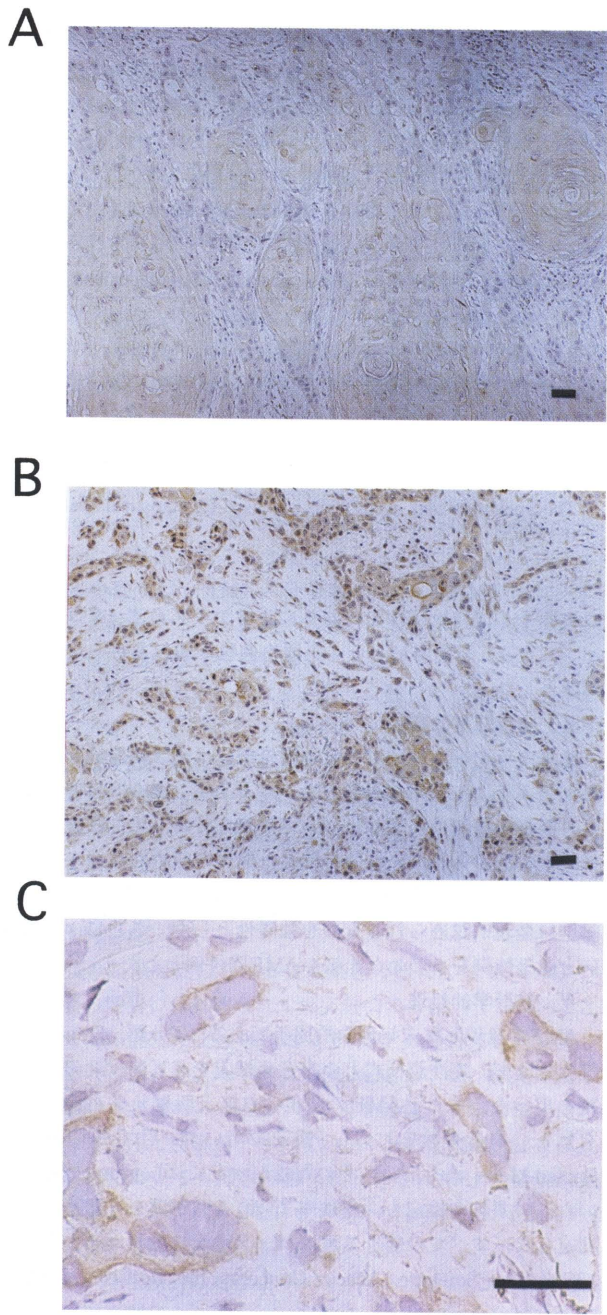


Fig. 1. Immunohistochemical staining of AMF in human oral squamous cell carcinomas. (A) Grade 3 of mode of invasion, a few of weak positive tumor cells were recognized around the tumor nests ( $\times 100$ ). (B) Grade 4C, many strong positive cells were recognized around the cord-like tumor nests ( $\times 100$ , bar=50  $\mu$  m). (C) Grade 4D, positive tumor cells invaded independently were recognized ( $\times 400$ , bar=50  $\mu$  m).

Table 3. Correlation between AMF expression and T classification

T classification	Number of cases with reactivity to AMF (%)			Total
	Negative	Weak positive	Strong positive	
1	12 (80.0)	0	3 (20.0)	15
2	14 (45.2)	13 (41.9)	4 (12.9)	31
3	2 (18.2)	5 (45.5)	4 (36.4)	11
4	2 (25.0)	3 (37.5)	3 (37.5)	8
Total	30 (46.2)	21 (32.3)	14 (21.5)	65

The Spearman rank correlation was used for statistical analysis ( $r=0.492$ ).

Table 4. Correlation between AMF expression and Stage

Stage	Number of cases with reactivity to AMF (%)			Total
	Negative	Weak positive	Strong positive	
I	11 (78.6)	0	3 (21.4)	14
II	11 (42.3)	12 (46.2)	4 (11.5)	26
III	2 (30.8)	5 (38.5)	4 (30.8)	13
IV	2 (33.3)	4 (33.3)	3 (33.3)	12
Total	30 (46.2)	21 (32.3)	14 (21.5)	65

The Spearman rank correlation was used for statistical analysis ( $r=0.537$ ).

ロールとして一次抗体の代わりに正常マウス血清 (ダコ・ジャパン, 東京) を使用し, 全く同様の過程で染色を行ったものを対照とした。

### Ⅲ. 染色強度の判定

免疫染色を行った後, 染色強度の判定は光学顕微鏡を用いて以下のように三段階に分類した。すなわち, 200倍の倍率で腫瘍の浸潤先進部の癌細胞について観察を行い, 陽性細胞が癌巣に全く認められないものを陰性, 発現が認められるが視野中の癌細胞の陽性率が49%以下のものを弱陽性, 50%以上の癌細胞に発現が認められるものを強陽性とした。さらに, 弱陽性例と強陽性例をあわせた症例をAMF陽性例とした。

### Ⅳ. 統計学的処理

AMFの発現と臨床病理学的因子である, T分類, Stage分類, 細胞分化度, 癌浸潤様式との有意差検定をスピアマンの順位相関を用いた。また, AMFの発現の有無と所属リンパ節転移の有無との有意差検定には $\chi^2$ 検定を用いた。生存率の算出はKaplan-Meier法を用い, その有意差検定にはLogrank検定を用いた。いずれの検定も, 危険率(p値)5%未満を有意差ありと判定した。すべての統計処理はパーソナルコンピュータを用いてStat View Software (Abacus Concepts, Inc, Berkeley, USA)にて行った。

## 成 績

### Ⅰ. 対象症例の臨床病理学的所見

65症例中の原発部位は, 舌が31例, 歯肉が20例, 口底が8例, 頬粘膜が3例, 口蓋粘膜が2例, 口唇が1例であった。臨床的因子であるT分類においては, T1が15例, T2が31例, T

Table 5. Correlation between AMF expression and mode of invasion

Grade	Number of cases with reactivity to AMF (%)			Total
	Negative	Weak positive	Strong positive	
1	10 (100)	0	0	10
2	4 (50.0)	4 (50.0)	0	8
3	16 (51.7)	14 (45.2)	1 (3.2)	31
4C	0	3 (23.1)	10 (76.9)	13
4D	0	0	3 (100)	3
Total	30 (46.2)	21 (32.3)	14 (21.5)	65

The Spearman rank correlation was used for statistical analysis of the relationship between immunohistochemical AMF expression and mode of invasion. AMF expression became strong as the grade of mode of invasion became higher, and a significant difference was recognized among them ( $r=0.679$ ).

Table 6. Correlation between AMF expression and Lymph node metastasis

Lymph node metastasis	Number of cases with reactivity to AMF (%)		
	Positive	Negative	Total
Metastasis (+)	14 (87.5)*	2 (12.5)	16
Metastasis (-)	21 (42.9)	28 (57.1)	49

There was a highly significant correlation between the metastasis cases and AMF positive cases. \* $p<0.005$ .

3が11例, T4が8例であり, さらに, Stage分類においては, Stage Iが14例, Stage IIが26例, Stage IIIが13例, Stage IVが12例であった。また, 所属リンパ節転移は16症例 (24.6%) に認められた。病理組織学的因子である細胞分化度においては高分化型が50例, 中分化型が11例, 低分化型が4例であり, さらに, 癌浸潤様式においては, 1型が10例, 2型が8例, 3型が31例, 4C型が13例, 4D型が3例であった。

### Ⅱ. AMF免疫染色像

AMF陽性細胞は正常口腔扁平上皮細胞, 結合組織には認められず, 癌細胞にのみ認められた。癌細胞におけるAMFの発現は細胞質から主に細胞膜に認められた(図1)。そのうち癌浸潤様式3型症例のAMF陽性細胞は結合組織と接する癌巣周囲の癌細胞に認められ, 癌巣の内部や中央での発現はわずかであった(図1A)。また浸潤様式4C型の症例においても3型と同様, 結合組織と接する癌巣周囲の癌細胞に強い発現を認めた(図1B)。一方, 浸潤様式4D型症例では, 癌細胞が単独でびまん性に散在しており, その各々の細胞膜上に強い発現を認めた(図1C)。

### Ⅲ. AMFの発現と臨床的因子との関連性

65症例中35症例 (53.8%) に陽性症例を認め, その内14症例 (21.5%) が強陽性, 21症例 (32.3%) が弱陽性, 30症例 (46.2%) が陰性であった。これらの所見と臨床的因子との関連のうちT分類との関係においては, T1 15例中の12例 (80.0%) が陰性, 他の3例 (20.0%) が強陽性, T2 31例中の14例 (45.2%) が陰性, 13例 (41.9%) が弱陽性, 4例 (12.9%) が強陽性と強陽性が少な

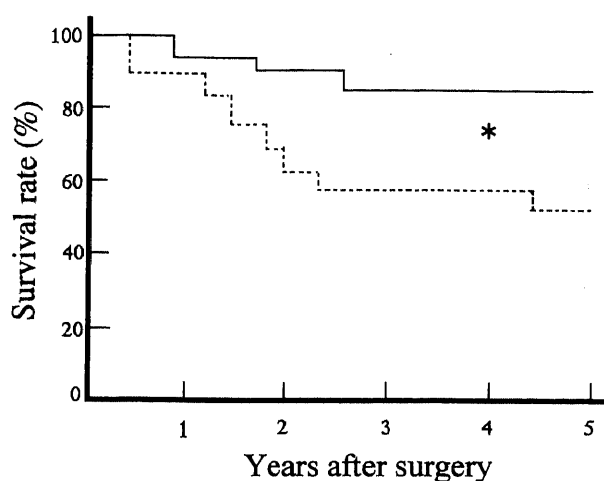


Fig. 2. Correlation between AMF expression and metastasis. Survival curves of 65 patients with oral squamous cell carcinoma. Survival rate of AMF negative cases was 84.5% (—) and AMF positive cases was 53.4% (-----). Significant difference was recognized among them by Logrank test (\* $p < 0.05$ ).

かったのに対し、T3 11例中の2例 (18.2%) が陰性、5例 (45.5%) が弱陽性、4例 (36.4%) が強陽性、T4 8例中の2例 (25.0%) が陰性、各3例 (37.5%) が弱陽性および強陽性と陽性症例が多い傾向にあった (表3)。これらの結果より、腫瘍が大きな症例ほど、AMFの発現は亢進していることが有意差をもって示された ( $r = 0.492$ )。また同時に、AMFの発現強度とStage分類との関係では、Stage I 14例中の11例 (78.6%) が陰性、他の3例 (21.4%) は強陽性、Stage II 症例26例中の11例 (42.3%) が陰性、12例 (46.2%) が弱陽性、3例 (11.5%) が強陽性と強陽性症例が少なかったのに対し、Stage III 13例中の4例 (30.8%) が陰性、5例 (38.5%) が弱陽性、4例 (30.8%) が強陽性、Stage IV 12例中の4例 (33.3%) が陰性、4例 (33.3%) が弱陽性、4例 (33.3%) が強陽性と強陽性が多い傾向にあった (表4)。これらの結果より、進行癌ほどAMFの発現は亢進していることが示された ( $r = 0.537$ )。なお、AMFの発現と腫瘍の原発部位との間には関連性は認められなかった。

#### IV. AMFの発現と病理組織学的因子との関連性

AMFの発現と癌浸潤様式との関係においては、最も低浸潤性の1型症例の10例中の全てが陰性であった。同じく低浸潤性の2型症例では、8例中の半数である4例が陰性、その他の症例すべてが弱陽性で、強陽性は認められなかった。また中等度浸潤性の3型症例では31例中の16例 (51.7%) が陰性、14症例 (45.2%) が弱陽性、強陽性が1例 (3.2%) に認められた。一方高度浸潤性の4C型では、13例中の3例 (23.1%) が弱陽性、強陽性が10例 (76.9%) と全例陽性であった。さらに最も高浸潤性の4D型では、3例全てが強陽性であった (表5)。これらの結果より、浸潤性癌ほどAMFの発現は亢進していることが示された ( $r = 0.679$ )。なお、AMFの発現と細胞分化度との間には明らかな相関が認められなかった。

#### V. AMFの発現と所属リンパ節転移形成率および生存率との関連性

AMFの発現と所属リンパ節転移の有無との関係を検索した

ところ、転移症例16例中の14例 (87.5%) がAMF陽性と高値であったのに対し、非転移症例49例中のAMF陽性症例は21例 (42.9%) と低く、AMFの発現が陽性である症例ほど転移率が高かった ( $p = 0.0019$ ) (表6)。また、Kaplan-Meier法による累積生存率の分析ではAMFの陰性症例の5年生存率は84.5%であるのに対し、陽性症例においては53.4%であり、AMFの発現が陽性である症例ほど予後不良であった ( $p = 0.0339$ ) (図2)。

#### 考 察

浸潤とは固型癌組織において、自己基底膜を喪失した癌細胞が解離をすることを始点とした現象であり、遊離した癌細胞は正常細胞や細胞外基質と接着し、さらに伸展と遊走をする。これらをLiottaら<sup>11)</sup>は、三段階浸潤説 (three steps theory) と命名し広く知られている。しかしながら、口腔扁平上皮癌の浸潤において、癌細胞の運動能が正常細胞と比較して亢進しているかどうか、また浸潤に対して影響をおよぼしているか否かについては不明である。癌細胞の運動能を亢進させる因子として、近年、AMFが注目されている。AMFは1986年にLiottaら<sup>7)</sup>により報告された、ヒトA2058メラノーマ細胞の培養上清中より同定されたケモタキシスおよびケモカインのサイトカインである。当初は、癌細胞において特異的に産生されるサイトカインだと考えられたが、その後の検索により、細胞内解糖系酵素であるフォスホヘキソースイソメラーゼ (phosphohexose isomerase)、また神経成長因子であるニューロロイキン (neuroleukin) と同じ構造を持つことが明らかにされ、正常細胞にも広く存在することが明らかにされた<sup>12)</sup>。AMFによる細胞反応の発現は、AMFが分子量78kDaのAMFレセプター (gp78) に結合することに始まる<sup>12)</sup>。そのシグナル伝達経路として、百日咳毒素感受性のG蛋白の活性化<sup>8)</sup>、イノシトールリン酸の産生<sup>13)</sup>、加えてレセプターのリン酸化、プロテインキナーゼCの活性化<sup>14)15)</sup>、により細胞内骨格であるアクチンフィラメント (actin filament) の伸張を促進することで運動能を促進すると考えられている。著者は第1報において、AMFの作用を阻害することにより、癌細胞の浸潤を抑制することが可能であることを明らかにした。本研究では、臨床組織に対するAMFの免疫染色を施行し、これらの所見と臨床病理学的因子との関連性を検討した。

今回の臨床組織における免疫染色の結果として、AMFの発現は癌の間質には認められず癌実質にのみ発現していたことから、ヒト口腔扁平上皮癌においてAMFは癌特異的に発現していることが明らかとなった。Takanamiら<sup>16)</sup>は、肺癌の臨床組織において癌部のみにAMFの発現を確認しているが、口腔癌においては未だ検索がなされていなかった。当研究により、口腔癌組織においても細胞の癌化にともないAMFの発現が亢進していることが明らかとなったが、その発現機序は不明であり、さらにその解明が望まれる。

また、今回検討した65症例のうち、35症例 (53.9%) にAMF陽性細胞を認めたことから、口腔扁平上皮癌においては比較的高率にAMFが発現しているものと思われ特殊症例においてのみ発現されるものではないことが示された。さらに、これらのAMF染色所見と臨床的因子との関連性を検討した結果、AMFの発現とT分類との間に明らかな相関が認められ、癌の増大にともないAMFの発現が亢進していることが示された。早期癌と進行癌の癌抑制遺伝子であるp53遺伝子欠失頻度を調査した



報告では、17p 染色体 (p53 遺伝子領域) 欠失頻度が進行癌で高く、他の染色体にも異常が発見される頻度が高くなると述べられている<sup>17)</sup>。したがって、癌が進展していく過程で遺伝子に付加的異常が加わり、悪性形質が促進される中で AMF の発現が亢進していると考えられる。同様に、Stage 分類との間にも相関が認められ、この結果より進行癌ほど AMF の発現は亢進していることが明らかとなった。肺癌の臨床組織における免疫染色の検索においても、進行症例においては有意差を持って AMF の発現が亢進していたとの報告がある。さらに、Hirono ら<sup>18)</sup>は胃癌において AMF レセプター (gp78) の免疫染色を行った結果、stage II, III との間において有意差をもってその発現は亢進していたと報告しており、AMF と進行癌とは密接な関係にあると考えられる。次に、AMF の発現と病理組織学的因子の癌浸潤様式<sup>9)</sup>との関連性について詳細に検討した。この癌浸潤様式細分類は口腔扁平上皮癌の悪性度と予後を病理組織学的に評価する重要な指標とされている。すなわち癌細胞の浸潤性が高度になるにつれて、癌細胞は小さく散在性となり最も高浸潤性の癌では、癌細胞は数個単位でび浸性に周囲組織へ浸潤する。この浸潤像は癌細胞のもつ生物学的特徴と癌細胞に対する宿主の反応によって成立しており、癌の特性を最も表現しているものの一つと考えられる。事実、癌浸潤様式と予後との相関は高く、またその診断に特殊な機器を必要としないことから、臨床において広く使用されている<sup>19)20)</sup>。本研究結果において、癌浸潤様式が高度な症例ほど、AMF の発現は亢進していた。特に、癌浸潤様式にて高浸潤性である 4C 型においては AMF 強陽性症例が 76.9 % と高率に認められ、さらに 4D 型症例においては全症例が強陽性であることから、癌の浸潤性と AMF との深い関連が示された。第 1 報において、癌浸潤様式の異なる症例より樹立されたそれぞれの細胞株において、4D 型細胞株のみが AMF 蛋白を産生し、高い細胞運動能を有しており、その 4D 型細胞株の浸潤は AMF の作用を阻害することにより抑制が可能であったことを報告した。これらを今回の臨床組織の結果とあわせて考慮すると、4D 型症例の保持する高度な浸潤性は、AMF による細胞運動促進作用が深く関与していると推測される。自己分泌様式の運動促進因子と癌浸潤能との関連を検索した報告はなく、今回の結果は高度浸潤癌の浸潤機構の解明に有用であると考えられる。また、AMF の発現と細胞分化度との関連性についても検討した。上皮細胞の癌化がより亢進している症例ほど細胞分化度は低下していると考えられ、実際に口腔扁平上皮癌の悪性度との関連を示す多数の報告があるが、今回の AMF と細胞分化度との間には有意な相関は認められなかった。Takanami ら<sup>16)</sup>の肺癌における検索においても、相関は認められておらず、細胞分化度の低下と AMF の発現機構とは直接的な関与はないものと考えられるが、その詳細な機序は不明である。

次に、AMF の発現と所属リンパ節転移形成率との関係を検索したところ、転移症例 16 例中の 14 例 (87.5 %) が AMF 陽性と高値であるのに対し、非転移症例 49 例中の AMF 陽性症例は 21 例 (42.9 %) と低く、有意な相関を認めて AMF の発現が陽性である症例ほど転移率を高率に形成していた。AMF の細胞運動能促進作用により腫瘍内部および周囲組織に分布しているリンパ管、動・静脈への癌細胞の侵入が容易となり、転移が促進されていると考えられる。Takanami ら<sup>16)</sup>の肺癌における検索においても、同様の理由にて転移が促進されていると述べている。

また、最近、Funasaka ら<sup>21)</sup>は癌細胞の産生する AMF が血管内皮細胞の有する AMF レセプターに作用し、内皮細胞の運動能が亢進することで血管壁に開裂が生じることを明らかにした。この結果より、AMF が傍分泌作用にて作用し癌細胞の血管への侵入を促進している可能性が示された。癌の浸潤において AMF が多面的に作用している可能性があり、今後の検索が期待される。さらに、Kaplan-Meier 法による累積生存率の分析では AMF の陰性症例の 5 年生存率は 84.5 % であるのに対し、陽性症例においては 53.4 % と AMF の発現が陽性である症例ほど予後不良という結果であった。この理由として、生存率を左右する大きな因子である所属リンパ節転移が AMF 陽性症例に高率に認められたためと考えられる。そして、リンパ節転移は浸潤性癌に多く認められることから、AMF による浸潤性の亢進が間接的に生存率を低下させたといえる。

以上より、AMF はヒト口腔扁平上皮癌の浸潤、進行、予後に深く関与していることが示された。第 1 報での実験的研究結果と今回の臨床組織における結果より、AMF による癌細胞の運動能の亢進は浸潤性ならびに悪性度を高めていることが示された。今後、癌の浸潤、転移の抑制において AMF 作用による癌の細胞運動能の制御は有用であると考えられ、臨床で問題となっている高度浸潤癌の治療にも新たな道を拓くものと期待される。

## 結 論

AMF により促進される癌細胞の運動能が口腔扁平上皮癌の浸潤能によぼす影響について検討する目的で、ヒト口腔扁平上皮癌組織の一次症例 65 例を用いて免疫組織化学的検討を行ったところ以下の結論を得た。

1. 原発部位では、舌 31 例、歯肉 20 例、以下、口底、頬粘膜、口蓋粘膜、口唇の順であった。臨床的因子である T 分類においては、T 1, T 2 が 45 例に対し、T 3, T 4 20 例であり、さらに、Stage 分類においては、Stage I, Stage II が 40 例、Stage III, Stage IV が 25 例であった。また、所属リンパ節転移は 16 症例 (24.6 %) に認められた。病理組織学的因子である細胞分化度においては高中分化型が 61 例と大多数をしめ、さらに、浸潤様式においては、1 型が 10 例、2 型が 8 例、3 型が 31 例、4C 型が 13 例、4D 型が 3 例であった。

2. 癌組織の免疫組織化学的所見において、正常粘膜上皮には AMF の発現が認められず、癌細胞にのみ発現が認められ、65 例中 14 例 (21.5 %) に強陽性、21 例 (32.3 %) が弱陽性、30 例 (46.2 %) が陰性であった。

3. AMF の発現強度と臨床的進行度との関連のうち、T 分類では、T 1 症例の 3/15 (20.0 %), T 2 症例の 6/31 (19.4 %), T 3 症例の 5/11 (45.5 %), T 4 症例の 3/8 (37.5 %) が強陽性であり、腫瘍が大きな症例ほど、AMF の発現は亢進していた ( $r=0.492$ )。また、Stage 分類との関係においても、stage I 症例の 3/14 (21.4 %), Stage II 症例の 5/26 (19.2 %), Stage III 症例の 4/13 (30.8 %), Stage IV 症例の 4/12 (33.3 %) が強陽性症例であり、進行癌ほど AMF の発現は亢進していた ( $r=0.537$ )。

4. 癌浸潤様式では、1 型症例 10 例全てが陰性、2 型症例 8 例中、陰性と弱陽性が各 4 例と強陽性症例は認められなかったのに対し、3 型症例 31 例中の 16 例 (51.7 %) が陰性、14 症例 (45.2 %) が弱陽性、強陽性が 1 例 (3.2 %) に認められた。さらに 4C 型 13 例中 3 例 (23.1 %) が弱陽性、10 例 (76.9 %) が強陽性と

全てが陽性、また4D型では3例全てが強陽性であり、癌浸潤様式が高度の症例ほどAMFの発現は亢進していた ( $r = 0.679$ )。なお、細胞分化度との相関関係は認められなかった。

5. AMFの発現と所属リンパ節転移の有無との関係を検索したところ、転移症例14/16 (87.5%) がAMF陽性と高値であったのに対し、非転移症例21/49 (42.9%) がAMF陽性症例と低く、AMFの発現が陽性である症例ほど転移率が高かった ( $p < 0.05$ )。

6. Kaplan-Meier法による累積生存率の分析ではAMFの陰性症例の5年生存率は84.5%であるのに対し、陽性症例においては53.4%と、AMFの発現陽性症例が予後不良であった ( $p < 0.05$ )。

以上の結果より、口腔扁平上皮癌の浸潤能はAMFによる運動能の亢進に依存していることが示唆され、自己分泌型運動促進因子が口腔扁平上皮癌の浸潤、転移および予後と密接な関係にあることが明らかとなった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、当研究の御指導、御校閲を賜りました恩師・山本悦秀教授、研究中、常に御助言、御指導をいただいた川尻秀一博士に深く感謝致します。さらに、本研究の遂行にあたり御協力を頂きました当講座の中川清昌助教授をはじめとする医局の諸先生方に感謝の意を表します。また、貴重な御助言を賜り、加えて実験材料を快く供与して下さった、群馬大学医学部整形外科科学講座渡辺秀臣講師に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Sutinen M, Kainulainen T, Hurskainen T, Vesterlund E, Alexander JP, Overall CM, Sorsa T, Salo T. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br J Cancer* 77(12): 2239-45, 1998
- 2) Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, Takeuchi H, Shirasuna K. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Oral Oncol* 34(6): 549-57, 1998
- 3) Mori S, Nose M, Morikawa H, Sato A, Saito T, Song ST, Tanda N, Teshima T. A novel evaluation system of metastatic potential of oral squamous cell carcinoma according to the histopathological and histochemical grading. *Oral Dis* 3(2): 82-5, 1997
- 4) Yamada K, Jordan R, Mori M, Speight PM. The relationship between E-cadherin expression, clinical stage and tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 3(2): 82-5, 1997
- 5) Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*, 235, 442-447, 1987
- 6) Carlile J, Harada K, Baillie R, Maccluskey M, Chisholm DM, Ogden GR, Schor SL, Schor AM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. *J Oral Pathol Med* 30(8): 449-57, 2001
- 7) Liotta LA, Mandler R, Murano G, et al. Tumor cell

autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3302-6, 1986

8) Watanabe H, Carmi P, Hogan V, Raz T, Silletti S, Nabi IR, Raz A. Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor. *J Biol Chem* 266: 13442-8, 1991

9) Yamamoto E, Kohama G, Sunakawa H, Iwai M, Hiratuka H. Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 51: 2175-80, 1983

10) 頭頸部癌取り扱い規約改訂第2版, 日本頭頸部腫瘍学会編 改訂第2版, 金原出版株式会社, 1991

11) Liotta, L.A. Tumor invasion and metastasis-Role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 46: 1-7, 1986

12) Watanabe H, Takehana K, Date M, Shinozaki T, Raz A. Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res* 56: 2960-3, 1996

13) Kohn EC, Liotta LA, Schiffmann E. Autocrine motility factor stimulates a three-fold increase in inositol trisphosphate in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 166(2): 757-64, 1990

14) Silletti S, Watanabe H, Hogan Victor et al. Purification of B16-F1 Melanoma Autocrine Motility Factor and Its Receptor. *Cancer Res* 51: 3507-11, 1991

15) Timar J, Silletti S, Bazaz R, Raz A, Honn KV. Regulation of melanoma-cell motility by the lipoxigenase metabolite 12-(S)-HETE. *Int J Cancer* 55(6): 1003-10, 1993

16) Takanami I, Takeuchi K, Naruke M, Kodaira S, Tanaka F, Watanabe H, Raz A. Autocrine motility factor in pulmonary adenocarcinomas: results of an immunohistochemical study. *Tumour Biol* 19(5): 384-9, 1998

17) 宮本美知子, 矢ノ下玲, 小西元子, 田中貴代子, 小池盛雄: 多段階発癌におけるp53遺伝子異常の意義. *実験医学*, 10, 964-8, 1992

18) Hirono Y, Fushida S, Yonemura Y, Yamamoto H, Watanabe H, Raz A. Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer. *Br J Cancer* 74(12): 2003-7, 1996

19) Shinohara M, Nakamura S, Harada T, Shimada M, Oka M. Mode of tumor invasion in oral squamous cell carcinoma: improved grading based on immunohistochemical examination of extracellular matrices. *Head Neck* 18(2): 153-9, 1996

20) Osaki T, Kimura T, Tatemoto Y, Dapeng L, Yoneda K, Yamamoto T. Diffuse mode of tumor cell invasion and expression of mutant p53 protein but not of p21 protein are correlated with treatment failure in oral carcinomas and their metastatic foci. *Oncology* 59(1): 36-43, 2000

21) Funasaka T, Haga A, Raz A, Nagase H. Tumor autocrine motility factor is an angiogenic factor that stimulates endothelial cell motility. *Biochem Biophys Res Commun* 285(1): 118-28, 2001

**Tumor Invasion and Autocrine Motility Factor in Oral Squamous Cell Carcinoma. Part2: Immunolocalization of the Human Materials** Narihiro Miyata, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., **111**, 114 — 120 (2002)

**Key words** autocrine motility factor, mode of invasion, human oral squamous cell carcinoma

#### **Abstract**

Autocrine motility factor (AMF) is a tumor-derived Mr 55.000 cytokine that has been identified as a specific motility-modifier of its cells. We examined how the motility accelerated by AMF is related to the tumor invasion of human oral squamous cell carcinoma (HOSCC). We tested for immunohistochemical reactivity of AMF in paraffin sections from HOSCC (n=65) and analyzed the relationship between AMF expression and clinicopathological factors. Normal oral epithelia were devoid of AMF immunostaining. Based on the intensity of the immunostaining in squamous cell carcinomas, 14 cases were strong positive, 21 cases were weak positive, and 30 cases were negative. The results of statistical analyses revealed the significant correlations with stage ( $r=0.537$ ) and t-classification ( $r=0.492$ ), and a highly significant correlation with mode of invasion ( $r=0.679$ ). Using a survival analysis by the Kaplan - Meier method, there was a significant correlation with prognosis. These results cleared the AMF accelerated the tumor invasion of HOSCC.